Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 1, Apr. May. 2017, p. 180- 190

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۳، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۳۹۶ ص.۱۹۰-۱۸۰

تغییرات خصوصیات عملکردی و پایداری پروتئین‌های سویای متصل شده به دکستران با استفاده از واکنش طبیعی مایلارد

ساره بوستانی[۱]، مرضیه موسوی نسب[۲]، محمود امینلاری[۳*]، مهرداد نیاکوثری[۴]، غلامرضا مصباحی[۵]

تاریخ دریافت:۱۳۹۳/۰۳/۲۶
تاریخ پذیرش:۱۳۹۵/۱۰/۲۶

چکیده

در این تحقیق پروتئین‌های ایزوله سویا با دکستران از طریق واکنش طبیعی مایلارد کانژوگه شد. الگوی الکتروفورز نشان داد کانژوگه‌های پروتئین-پلی ساکارید شکل گرفته‌اند. اندازه‌گیری شدت قهوه‌ای شدن و میزان جذب UV نتایج الکتروفورز را تأیید کرد. بررسی خصوصیات عملکردی پروتئین‌های نشان داد که پایداری حرارتی، حلالیت و خصوصیات امولسیفایری پروتئین‌های سویا با کانژوگه شدن بهبود یافته است. پایداری نوشیدنی سویای تولید شده با پروتئین‌های کونژوگه در مقابل فرایند حرارتی و در طول زمان نگهداری در مقایسه با نوشیدنی سویای تهیه شده بر پایه پروتئین‌های غیرکونژوگه افزایش یافت. در مجموع می‌توان نتیجه‌گیری کرد که امکان استفاده از واکنش مایلارد به‌عنوان راهی برای تهیه کانژوگه‌های پروتئین‌های سویا-دکستران با خصوصیات عملکردی و پایداری بهتر وجود دارد.

واژه های کلیدی: پایداری، خصوصیات عملکردی، سویا، واکنش مایلارد

مقدمه

پروتئین‌ها نقش اساسی در سیستم‌های بیولوژیکی و غذایی به‌عهده دارند و اغلب در برابر حلال‌های آلی، حرارت و سایر عوامل تخریب‌کننده حساس می‌باشند که استفاده از این ماکرومولکول‌های بی‌نظیر را در صنایع غذایی، طی سالیان با چالش‌های گوناگونی مواجه کرده است. ناپایداری پروتئین‌ها در سیستم‌های غذایی، نداشتن خصوصیات قابل انتظار پس از فرآیندهای غذایی و مسائلی از این دست، سبب شده است که راه کارهایی به‌منظور بهبود خصوصیات عملکردی پروتئین‌ها اندیشیده و توسط محققان به‌کار گرفته شود. سویا به‌عنوان یکی از مهمترین منابع پروتئینی به‌علت دارا بودن ارزش غذایی بالا و خصوصیات عملکردی بی‌نظیرش شناخته شده و تاکنون محصولات مختلفی از سویا به بازار ارائه شده است. استفاده از این پروتئین‌های پرکاربرد همانند سایر منابع پروتئینی به‌علت ناپایدار بودن در برابر حرات و سایر عوامل آسیب‌رسان در فرآیندهای غذایی همواره با مشکلاتی در صنعت روبرو بوده است (Endres, 2001, Diftis and Kiosseoglou, 2006).

به‌منظور بهبود پایداری و خواص عملکردی پروتئین‌ها، تیمارهای گوناگون شیمیایی، فیزیکی و آنزیمی بر روی آن‌ها صورت می‌گیرد، به‌علت مخاطرات روش‌های شیمیایی برای سلامتی و هزینه‌بر بودن روش‌های اصلاح آنزیمی و فیزیکی، تکنولوژیست‌ها به استفاده از روش‌های کم‌خطر، کم‌هزینه و طبیعی برای اصلاح پروتئین‌های متمایل شده‌اند (Dickinson, 2003). پروتئین‌ها می‌توانند به‌صورت کووالانسی و غیرکووالانسی با سایر ماکروملکول‌ها[2] متصل شوند. یکی از روش‌های جدید اصلاح پروتئین‌ها که نیازی به واکنشگر شیمیایی ندارد، کم‌هزینه و کاملاً طبیعی است، اصلاح با استفاده از واکنش مایلارد می‌باشد که بر اساس ایجاد پیوند با سایر ملکول‌ها می‌باشد، در این واکنش اتصال کووالانسی میان گروه‌های آمین آزاد پروتئین و گروه کربونیلی پلی‌ساکارید[3] تحت شرایط کنترل شده رطوبت، حرارت، pH، نسبت مناسب واکنشگرها و غیره صورت می‌پذیرد (Kato *et al*, 1991).

۱، ۴و ۵- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز. شیراز.
۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی و گروه پژوهشی آبزیان، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز
۳- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی و گروه بیوشیمی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز.
(* - نویسنده مسئول: Email: aminlari@shirazu.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v1395i0.39329

2 Macromolecules
3 Polysaccharide

مطالعـات مختلفـی در رابطـه بـا اصـلاح و بهبـود خصوصـیات عملکردی پروتئین‌های سویا با کانژوگه شدن صورت گرفته است، Qi و همکاران (۲۰۰۹) اقدام به کانژوگه کردن پروتئین سویا با دکستران کردند و طی آن افزایش ویژگی‌هـای امولسـیون‌کننـدگی و افـزایش پایداری حرارتـی مشـاهده شـد. Mu و همکـاران (۲۰۱۰) اقـدام بـه کانژوگه کردن پروتئین ایزوله شده سویا و صمغ عربی کردند و طـی آن حلالیـت و خصوصـیات امولسـیفایری بهبـود یافـت. Babiker و همکاران (۱۹۹۸) نشان دادند که کانژوگـه‌کـردن پـروتئین سـویا بـا گالاکتومنان به‌طور قابل ملاحظه‌ای آلرژی‌زایی[1] را کاهش مـی‌دهـد. Usui و همکاران (۲۰۰۴) اقدام به کانژوگه کردن پروتئین‌های سویا با کیتوزان کردند و طی آن فعالیت ضدمیکروبی کانژوگه در مقایسه بـا شاهد افزایش یافت. بوستانی و همکاران (۱۳۹۵) گزارش کردنـد کـه خصوصیات عملکردی پروتئین‌های سویا از طریق کانژوگه شـدن بـا مالتودکسترین بهبود می‌یابد.

با وجود پژوهش‌های متعدد انجام شده در زمینه بهبود پایداری و خصوصیات عملکردی پروتئین‌های سویا، مستندات کمی در رابطه بـا بررسی خصوصیات محصول تولیـد شـده از پـروتئین‌هـای کونژوگـه می‌باشد. لذا هدف این مطالعه اصلاح پـروتئین‌هـا از طریـق واکـنش مایلارد و تولید نوشیدنی بر پایه پروتئین‌های کونژوگه شده و بررسی پایداری محصول نهایی در مقابل فرایند حرارتـی[2] و در طـول زمـان نگهداری می باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

ایزوله پروتئینی سویا[3] (حـاوی ۹۰ درصـد پـروتئین بـر مبنـای خشک) ساخت چین و دکسـتران[4] بـا وزن ملکـولی ۶۴۰۰۰-۷۶۰۰۰ دالتون (از شرکت سیگما آمریکا) تهیه شد، مواد مـورد اسـتفاده بـرای تهیه نوشیدنی از بازار محلی و سایر مواد شـیمیایی مـورد اسـتفاده از شرکت‌های معتبر مواد آزمایشگاهی تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

کانژوگه کردن پروتئین‌های سویا با دکستران

ابتدا پروتئین ایزوله سویا و دکستران به نسبت ۱ بـه ۴ در بـافر فسـفات ۰/۱ مـولار بـا pH: ۸/۵ کـاملاً مخلـوط و سـپس توسـط خشک‌کن انجمادی[5] به پودر تبدیل شد، پودر حاصل در حضور برمید پتاسیم اشباع (رطوبت نسبی ۷۹٪) در دسیکاتور و در زمان‌های ۰، ۱، ۲، ۳، ۴، ۶ و ۸ روز در دمای ۶۰ درجـه سـانتی‌گـراد قـرار گرفـت تـا کانژوگه شدن رخ دهد، نمونه شاهد بدون دکستران و در شرایط کاملاً مشابه تهیه شد.

الکتروفورز SDS-PAGE[6]

برای تأیید تشکیل کانژوگه‌های پروتئین-پلی‌ساکارید، الکتروفورز SDS- PAGE مطابق روش (1970) Laemmli و با کمی تغییـرات صورت پذیرفت. ژل افقی الکتروفورز با ۳ درصد ژل متـراکم‌کننـده و ۱۰ درصد ژل جداکننده تهیه شد و دستگاه الکتروفورز دو طرفه بیو راد ساخت سنگاپور مورد استفاده قرار گرفت. نمونه به غلظت ۲ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر در بافر نمونه مخلوط و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد و در هر چاهک ۲۰ میکرولیتر نمونه تزریق شد. میزان جریان الکتریسیته روی ۲۵ میلی‌آمپر تنظیم شـد و در انتها رنگ‌آمیزی در محلول محتوی کوماسی بریلیانت‌بلو و متانول و رنگ‌زدایی در محلـول محتـوی اسـتیک اسـید و متـانول صـورت پذیرفت.

اندازه‌گیری شدت قهوه‌ای شدن

به‌منظور تعیین پیشرفت کانژوگه‌شدن ارزیابی تغییرات رنگـی بـا استفاده از اندازه‌گیری میزان قهوه‌ای شدن صورت گرفت. نمونه‌ها به غلظت ۰/۲ درصد پروتئین در SDS[7] ۱ درصد تهیه شـدند و میـزان قهوه‌ای شدن با اندازه‌گیری میزان جذب در ۴۲۰ نانومتر تعیـین شـد (Li و همکاران، ۲۰۰۹).

اندازه‌گیری جذب UV

اندازه‌گیری میزان جذب در ناحیه UV مطابق روش Lertittikul و همکاران (۲۰۰۷) و با کمی تغییرات انجام شد. ابتـدا نمونـه‌هـا بـه غلظت ۰/۲ درصد پروتئین در SDS ۱ درصـد تهیـه شـدند و میـزان جذب در طول موج ۲۹۴ نانومتر خوانده شد، عدد خوانده شده به‌عنوان معیاری از میزان کانژوگه‌شدن محسوب شد و افـزایش میـزان جـذب نشان از تشکیل بیشتر کانژوگه‌ها می‌باشد.

اندازه‌گیری حلالیت پروتئین

اندازه‌گیری حلالیت نمونـه‌هـا در pHهـای ۳، ۵، ۷ و ۹ مطـابق روش Liu و همکاران (۲۰۱۲)، صورت پذیرفت. ابتـدا تعیـین میـزان پروتئین کل به روش کلدال انجام شد و برای اندازه‌گیری پروتئین‌های موجود در مایع فوقانی از روش لوری استفاده شد و مطابق فرمول زیر

1 Allergenicity
2 Thermal processing
3 Soy protein isolate (Pingdingshan tianjing plant albumen CO.,LTD)
4 Dextran
5 Freeze dryer
6 Sodium-dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)
7 Sodium-dodecyl-sulphate

درصد حلالیت محاسبه گردید.

() ۱۰۰× (میزان نیتروژن نمونه/ میزان نیتروژن در مایع فوقانی)= درصد حلالیت

اندازه‌گیری خصوصیات امولسیفایری

فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون مطابق روش Pearce and Kinsella (1978) اندازه‌گیری شد. بدین صورت که ابتدا یک میلی‌لیتر روغن ذرت به ۳ میلی‌لیتر نمونه به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH معادل ۷/۴ افزوده و کاملاً مخلوط شد، سپس با هموژنایزر با دور ثابت به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط هموژنیزه شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از امولسیون تهیه شده در فواصل زمانی ۰ تا ۱۰ دقیقه برداشته و ۵ میلی‌لیتر سدیم دودسیل سولفات ۰/۱درصد به آن اضافه و بلافاصله جذب نوری آن‌ها در طول موج ۵۰۰ نانومتر تعیین شد و منحنی مربوطه بر اساس میزان جذب و مدت زمان ۱۰ دقیقه رسم شد. فعالیت امولسیون‌کنندگی از طریق اندازه‌گیری میزان جذب بلافاصله پس از تشکیل امولسیون محاسبه شد (میزان جذب در زمان صفر). پایداری امولسیون تشکیل شده نیز با تعیین مدت زمانی که طول می‌کشد تا میزان کدورت اولیه امولسیون به نصف کاهش یابد، از روی منحنی جذب در طول موج ۵۰۰ نانومتر و در مدت ۱۰ دقیقه محاسبه گردید.

تهیه نوشیدنی سویا

به‌منظور خارج‌سازی دکستران آزاد، پروتئین‌های سویای کانژوگه شده، توسط سولفات آمونیوم اشباع با سانتریفوژ در دور ۱۵۰۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه رسوب داده شد، رسوب حاصل چندبار در آب مقطر کاملاً شسته و لیوفیلیزه گردید و سپس به‌منظور خارج‌سازی یون‌های آمونیوم و سولفات موجود در نمونه اصلاح شده به مدت ۴۸ ساعت در برابر آب مقطر دیالیز گردید. نمونه شاهد نیز که در شرایط مشابه گرمخانه‌گذاری شده بود، به‌منظور حداقل کردن خطای آزمون، تحت تیمار با آمونیوم سولفات قرار گرفت و دیالیز گردید. برای تهیه نوشیدنی پروتیئن‌های ایزوله سویا (یک نمونه حاوی پروتئین‌های ایزوله سویای طبیعی و یک نمونه حاوی پروتئین‌های ایزوله سویای گلیکوزیله شده) به میزان ۵٪ به‌همراه ۲٪ مالتو دکسترین، ۰/۱٪ پور زنجبیل، ۰/۲۵٪ صمغ عربی، ۰/۱٪ نمک، ۳٪ ساکاروز و آب کاملاً مخلوط شد، سپس به دمای ۶۵-۷۰ درجه سانتی‌گراد رسید و هموژن گردید (Damodaran, 1996, Touré *et al*, 2009).

بررسی پایداری پروتئین‌ها در نوشیدنی

در ادامه به‌منظور ارزیابی پایداری حرارتی نمونه‌های نوشیدنی سویا، نمونه‌های نوشیدنی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد حرارت‌دهی شد. به‌منظور ارزیابی پایداری نمونه‌های نوشیدنی سویای حرارت دیده، بررسی تغییرات ظاهری نمونه‌ها و تشکیل میزان رسوب در زمان‌های ۰ (بلافاصله بعد از حرارت‌دهی)، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ روز بعد از نگهداری در دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. مطابق قبل نمونه‌ها در لوله آزمایش قرار گرفتند و بعد از سپری شدن زمان نگهداری، درصد میزان فاز جدا شده به‌عنوان معیاری از پایداری در نظر گرفته شد، بدین ترتیب که در صورت عدم وجود دو فاز شدن پایداری ۱۰۰درصد و در صورت مشاهده دو فاز شدن (بر اساس میزان فاز جدا شده) درصد پایداری کاهش میابد.

تجزیه وتحلیل آماری داده‌ها

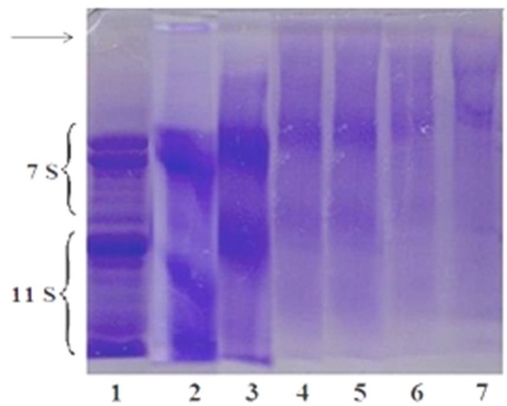
به‌منظور آنالیز آماری داده‌ها و بررسی اطلاعات بدست آمده از آزمون‌های مختلف از طرح کاملاً تصادفی استفاده گردید. آزمون‌ها حداقل در سه تکرار انجام شده و سپس میانگین و انحراف معیار بدست آمد. به‌منظور تعیین وجود اختلاف بین میانگین اعداد (سه تکرار هر آزمایش)، از آنالیز واریانس و برای گروه‌بندی آنها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۰/۰۵ استفاده شد. در تمام مراحل، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

الکتروفورز

الگوی الکتروفورز نمونه‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است، در ستون شماره ۱ باندهای پروتئینی مربوط به گلوبولین‌های 7S و 11S به‌خوبی مشخص است و با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری (ستون‌های ۲ تا ۷) باعث ظاهر شدن تدریجی یک باند کشیده، وسیع و متراکم در ابتدای ژل که مربوط به اجزاء با وزن مولکولی بالای تشکیل شده در طی واکنش مایلارد می‌باشد، می‌شود، در این نمونه‌ها پروتئین‌هایی با حرکت الکتروفورتیکی کمتر از پروتئین ایزوله سویا مشاهده می‌شود که بصورت باندهای گسترده و وسیع دیده شده و با گذشت زمان، این باندها گسترده‌تر می‌شوند و همزمان باندهای مربوط به پروتئین سویا ضعیف‌تر و کمرنگ‌تر می‌شود و به‌نظر می‌رسد بیشترین کانژوگه شدن پس از ۸ روز گرمخانه‌گذاری رخ داده است (بوستانی و همکاران، ۱۳۹۵ ,Kato *et al* 1991, Babiker *et al* 1998, Kato 2002). Alahdad و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند، با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری واکنش مایلارد به‌منظور کانژوگه کردن لیزوزیم با دکستران از زمان صفر تا یک هفته شدت باندهای اصلی پروتئینی کاهش یافته و همزمان گستردگی باندهای کانژوگه ها افزایش می‌یابد. Aminlari و همکاران (۲۰۰۵) با تهیه کانژوگه‌های لیزوزیم -دکستران و کازئین -دکستران گزارش کردند افزایش زمان

گرمخانه‌گذاری منجر به تشکیل کانژوگه‌های با وزن ملکولی متفاوت در ابتدای ژل جداکننده می‌شود. Yadav و همکاران (۲۰۱۲) با کانژوگه کردن پروتئین شیر و صمغ فیبر ذرت نتایج مشابهی مبنی بر تأثیر زمان گرمخانه‌گذاری بر میزان کانژوگه‌شدن گزارش کردند.



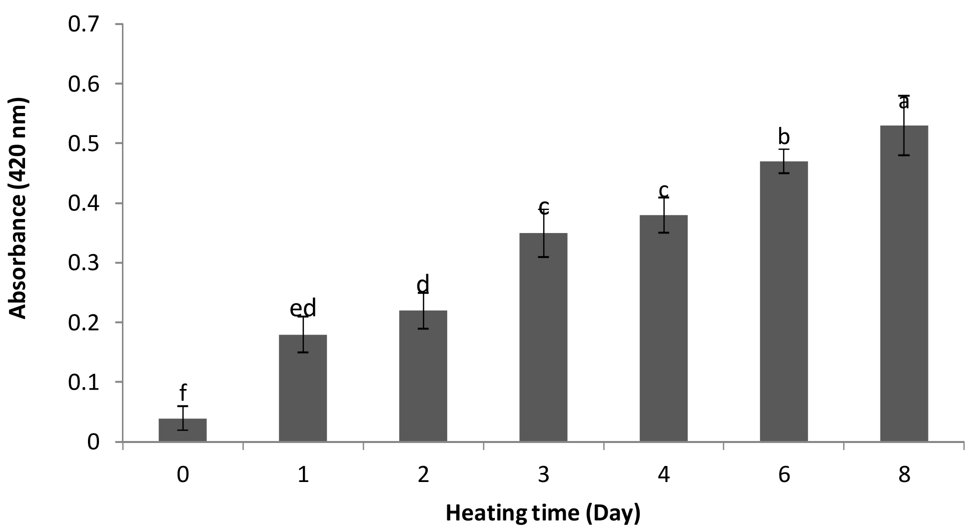
شکل ۱- الگوی الکتروفورز پروتئین‌های سویای کانژوگه شده با دکستران در دمای ۶۰ °C و pH: ۸/۵ و زمان‌های مختلف. (شماره ستون‌ها به‌ترتیب: ۱= نمونه کنترل (پروتئین‌های سویا)، ۲= نمونه کانژوگه شده به مدت ۱ روز، ۳= نمونه کانژوگه شده به مدت ۲ روز، ٤= نمونه کانژوگه شده به مدت ۳ روز، ٥= نمونه کانژوگه شده به مدت ٤ روز، ٦= نمونه کانژوگه شده به مدت ٦ روز، ٧= نمونه کانژوگه شده به مدت ۸ روز)

شدت قهوه‌ای شدن

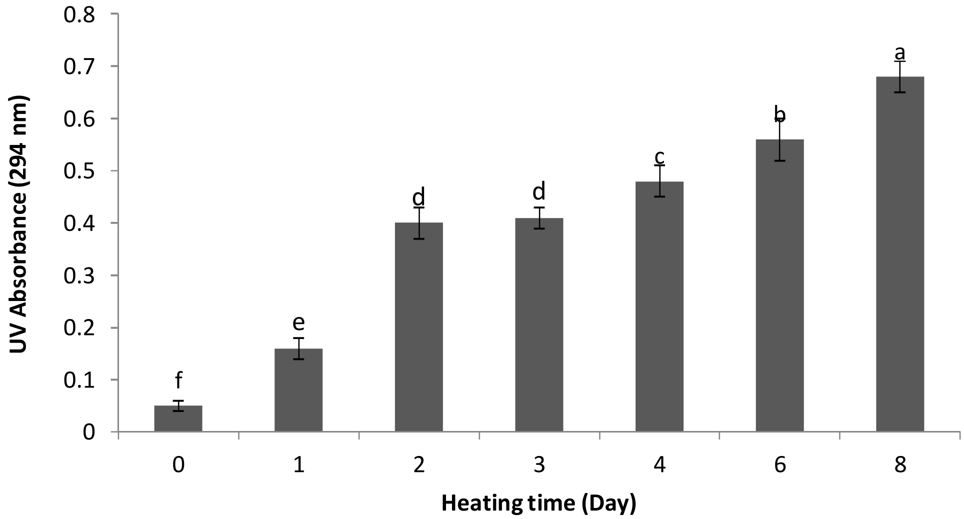
نتایج حاصل از اندازه‌گیری شدت قهوه‌ای شدن در شکل ۲ نشان داده شده است. مطابق نمودار از همان زمان‌های اولیه گرمخانه‌گذاری میزان جذب در مقایسه با نمونه شاهد افزایش شدیدی یافته که گویای شکل‌گیری کانژوگه‌های پروتئین-پلی‌ساکارید می‌باشد. با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری شدت قهوه‌ای شدن افزایش می‌یابد و بیشترین میزان جذب در نمونه ۸ روز گرمخانه‌گذاری شده مشاهده می‌شود. Li و همکاران (۲۰۱۳ و ۲۰۰۹) نتایج مشابهی مبنی بر رابطه بین افزایش میزان قهوه‌ای شدن و تشکیل کانژوگه‌ها ارائه کردند.

تغییرات میزان جذب UV

تعیین میزان جذب در طول موج ناحیه UV یکی دیگر از راه‌های تشخیص کانژوگه شدن می‌باشد، ترکیبات حد واسط حاصل از واکنش مایلارد از جمله دی و پلی‌کربونیل جذب بالایی در این ناحیه دارند (Lertittikul *et al*, 2007, Ajandouz *et al*, 2008). مطابق نتایج شکل ۳ با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری میزان جذب در این ناحیه افزایش یافته که تأییدی بر تشکیل کانژوگه‌های حاصل از واکنش مایلارد می‌باشد. Ajandouz و همکاران (۲۰۰۸) با کانژوگه کردن گلوکوز و پروتئین‌های سرم آلبومین گاوی و کازئین، Lertittikul و همکاران (۲۰۰۷) با کانژوگه کردن پروتئین پورسین پلاسما با گلوکوز نتایج مشابهی مبنی بر افزایش میزان جذب در ناحیه UV گزارش کردند.



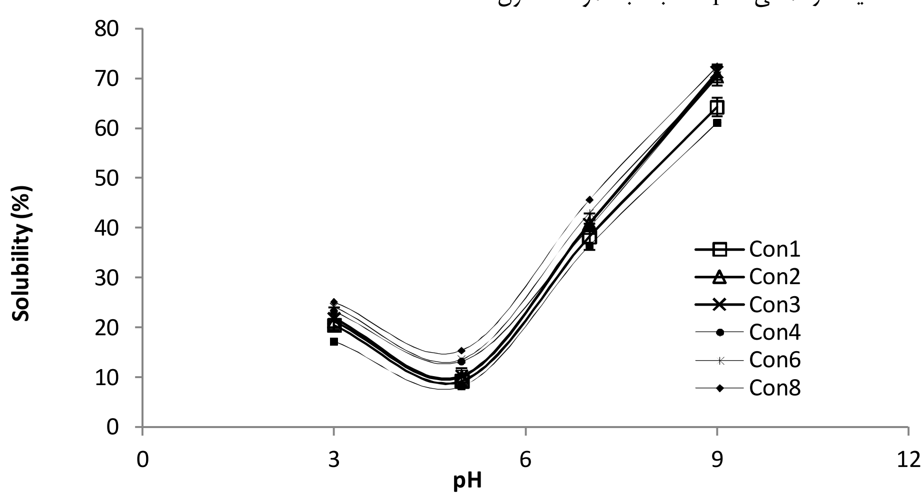
شکل ۲- شدت قهوه‌ای شدن در زمان‌های مختلف گرمخانه‌گذاری (هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می‌باشد و حروف لاتین نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده‌ی اختلاف آماری معنادار می‌باشد)



شکل ۳- میزان جذب در ناحیه UV در زمان‌های مختلف گرمخانه‌گذاری (هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می‌باشد و حروف لاتین نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده‌ی اختلاف آماری معنادار می‌باشد)

تأثیر کانژوگه شدن بر حلالیت پروتئین‌ها

نمودار معمول تغییر حلالیت پروتئین‌های سویا در مقابل تغییرات pH محیط به صورت یک منحنی U شکل است و پایین‌ترین نقطه این منحنی بین مقادیر pH ۴ و ۵ می باشد کـه نشـان‌دهنـده نقطـه ایزوالکتریک پروتئین‌های سویا در این محدوده می‌باشد (Babiker *et al*, 1998). با گلیکوزیله کردن پروتئین‌های سویا مطابق نمـودار ۴، مشاهده می‌شود که حلالیت در تمامی pHها نسبت به نمونه کنتـرل بطور معناداری افزایش می‌یابـد. Chiu و همکـاران (۲۰۰۹) و Liu و همکاران (۲۰۱۲) نتایج مشابهی مبنی بر بهبود حلالیت پروتئین‌ها با کانژوگه شدن مشاهده کردند. کانژوگه شدن با پلی‌ساکارید هیدروفیل و آبدوست، ارتباط بین پروتئین و ملکول آب را بهبـود بخشـیده و در نتیجه باعث افزایش حلالیـت پـروتئین مـی‌شـود (Babiker *et al*, 1998, Chiu *et al*, 2009, Liu *et al*, 2012).



شکل٤- درصد حلالیت پروتئین سویای شاهد و کانژوگه‌ها در pHهای مختلف و در زمان‌های مختلف گرمخانه‌گذاری (نمودارها نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می‌باشد). **con1: نمونه گرمخانه‌گذاری شده به مدت ۱ روز، con2: نمونه گرمخانه‌گذاری شده به مدت ۲ روز، con3: نمونه گرمخانه‌گذاری شده به مدت ۳ روز، con4: نمونه گرمخانه‌گذاری شده به مدت ٤ روز، con6: نمونه گرمخانه‌گذاری شده به مدت ٦ روز، con8: نمونه گرمخانه‌گذاری شده به مدت ۸ روز، control: نمونه پروتئین‌های سویای شاهد**

تأثیر گلیکوزیله شدن بر خصوصیات امولسیفایری

نتایج حاصل از فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیون در جدول ۱ گزارش شده است، همان‌طور که مشاهده می‌شود، کانژوگه شدن باعث بهبود خصوصیات امولسیفایری می‌شود و با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری و پیشرفت کانژوگه شدن، روند بهبود این خصوصیات بیشتر می‌شود.

جدول ۱- خصوصیات امولسیفایری پروتئین‌های سویا

نمونه‌ها	خصوصیات امولسیفایری	
	فعالیت امولسیفایری (A_{500})	پایداری امولسیون(min)
پروتئین های سویا	۰/۴۱±۰/۰۴[e]	۶/۳۵±۰/۱۹[b]
کانژوگه ۱ روز گرمخانه‌گذاری شده	۰/۵۳±۰/۰۴[d]	۶/۸۳±۰/۱۱[b]
کانژوگه ۲ روز گرمخانه‌گذاری شده	۰/۶۴±۰/۰۳[c]	۷/۳۵±۰/۴۲[ab]
کانژوگه ۳ روز گرمخانه‌گذاری شده	۰/۶۲±۰/۰۵[c]	۷/۲۴±۰/۲۷[ab]
کانژوگه ۴ روز گرمخانه‌گذاری شده	۰/۸۶±۰/۰۶[b]	۸/۱۶±۰/۲۴[a]
کانژوگه۶ روز گرمخانه‌گذاری شده	۱/۰۱±۰/۰۸[a]	۸/۵۸±۰/۳۱[a]
کانژوگه ۸ روز گرمخانه‌گذاری شده	۱/۱۲±۰/۰۷[a]	**

* اعداد موجود در جدول میانگین سه تکرار± انحراف معیار و حروف نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد

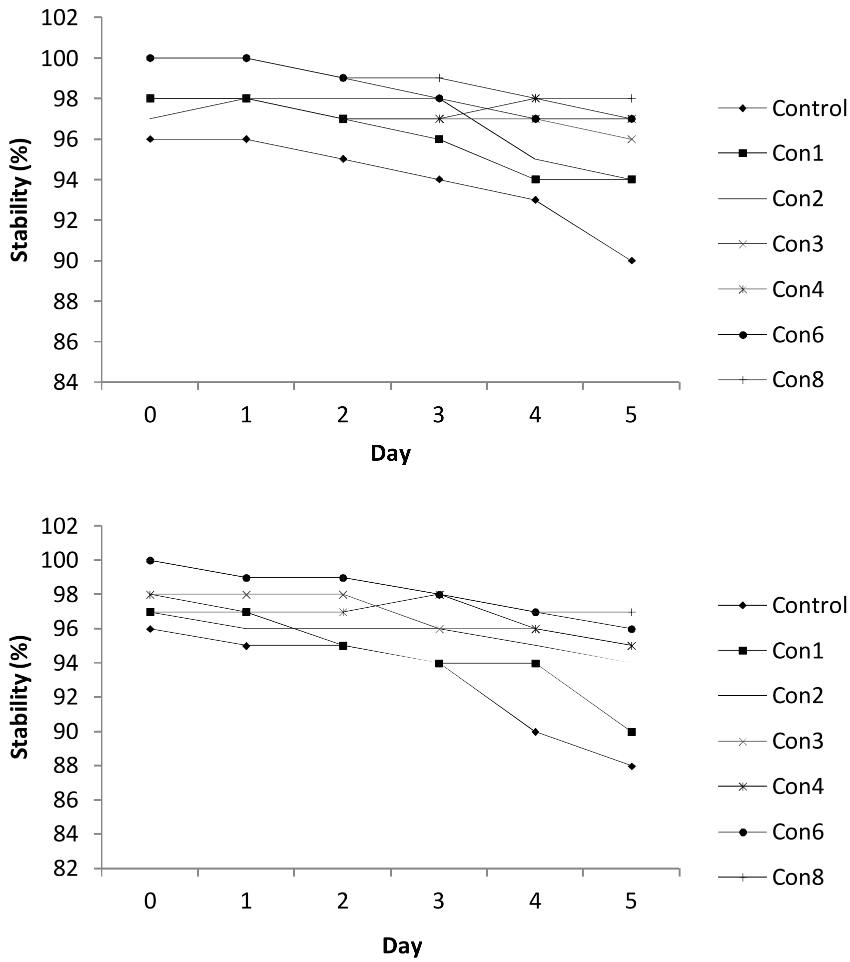
** امولسیون بعد از گذشت ده دقیقه دو فاز نشد.

نتایج مشابهی توسط Liu و همکاران (۲۰۱۲)، با کانژوگه کردن پروتئین‌های بادام زمینی و دکستران و Diftis و Kiosseoglou 2003))، با کانژوگه کردن پروتئین‌های سویا و کربوکسی‌متیل‌سلولز گزارش شد. بالاتر بودن خصوصیات امولسیفایری گلیکوکانژوگه‌ها می‌تواند به دلیل تأثیر همزمان خصوصیات خوب امولسیفایری پروتئین و پایدارکنندگی پلی‌ساکارید در یک ملکول باشد که از جدا شدن چربی جلوگیری کرده و در نتیجه فعالیت امولسیفایری بهبود می‌یابد (Chiu et al, 2009, Diftis and Kiosseoglou, 2003). پروتئین‌ها در لایه بین سطحی آب و روغن جذب شده تا یک لایه پیوسته ویسکوالاستیک را تشکیل دهد، در حالی که پلی‌ساکاریدها پایداری کلوئید را بواسطه خصوصیات قوام‌دهندگی و ژله‌کنندگی در فاز آبی، افزایش می‌دهند، بنابراین کانژوگه‌های پروتئین–پلی‌ساکارید خصوصیات خوب امولسیفایری را از خود نشان می‌دهد (Kato, 2002).

بررسی پایداری نوشیدنی سویا

پایداری در طول نگهداری از خصوصیات مهم نوشیدنی‌های صنعتی به‌منظور استفاده مصرف‌کنندگان می‌باشد. فاکتورهای زیادی نظیر سازش‌پذیری با سایر اجزای غذایی، میزان و نوع ترکیبات بکار رفته، وجود پایدارکننده‌ها و غیره در پایداری محصول نهایی تأثیرگذار می‌باشد. مطابق نتایج شکل ۵ اختلاف معناداری بین پایداری نوشیدنی‌های تهیه شده بر پایه پروتئین‌های کونژوگه در مقایسه با نمونه‌های شاهد در هر دو دمای نگهداری وجود دارد.

درصد بالایی از اجزای سازنده بخش خشک (ماده خشک) نوشیدنی سویای تولیدی را پروتئین‌ها تشکیل داده (۴۰ تا ۴۵٪ درصد)، پروتئین‌های سویا در مقابل عوامل مختلفی چون حرارت اعمال شده طی فرایندهای حرارتی و حرارت‌های پایین طی انجماد و نگهداری حساس می‌باشند چون ممکن است باعث واسرشت شدن بیشتر پروتئین شده و از این رو پایداری را تحت تأثیر قرار دهد .مطالعات نشان می‌دهد که کانژوگه شدن موجب افزایش پایداری حرارتی پروتئین‌ها می‌شود. دمای واسرشت شدن بالاتر، گویای افزایش پایداری حرارتی پروتئین‌ها یا پایداری ساختار سوم در حالت گلیکوزیله شده در مقایسه با شاهد می‌باشد، با اتصال کووالانسی پلی‌ساکارید هیدروفیل و باردار به پروتئین، اتصالات هیدروژنی و الکتروستاتیک در ساختار سوم و چهارم پروتئین بیشتر شده و ساختار سوم پایدارتر می‌شود و در نتیجه دمای واسرشت شدن افزایش می‌یابد و در نتیجه پروتئین‌ها مقابل حرارت‌های اعمال شده پایدارتر می‌گردند (Liu *et al*, 2012, Xu *et al*, 2010). همچنین مطابق شکل ۴ حلالیت پروتئین‌ها نیز با کانژوگه شدن بهبود یافت، بعلاوه خصوصیات امولسیفایری پروتئین‌ها نیز با اصلاح از طریق واکنش مایلارد بهبود می‌یابد (جدول ۱). می‌توان گفت وجود تفاوت در پایداری در طول زمان نگهداری نمونه‌های نوشیدنی تولیدی به‌خاطر واسرشت شدن بیشتر پروتئین‌ها در نمونه شاهد و نیز حلالیت بالاتر پروتئین‌ها در نمونه کانژوگه می‌باشد، بنابراین تحت تأثیر عواملی از جمله افزایش دمای واسرشت شدن و حلالیت بالاتر و خصوصیات امولسفایری بهتر پروتئین‌ها در نمونه کانژوگه، نوشیدنی حاصل دارای پایداری بهتری می‌باشد (Millqvist-Fureby, 2001, Kato, 2002).



شکل۵- درصد پایداری نوشیدنی سویا در زمان‌های مختلف گرمخانه‌گذاری (نمودارها نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می‌باشد). **con1: نمونه گرمخانه‌گذاری شده به مدت ۱ روز، con2: نمونه گرمخانه‌گذاری شده به مدت ۲ روز، con3: نمونه گرمخانه‌گذاری شده به مدت ۳ روز، con4: نمونه گرمخانه‌گذاری شده به مدت ٤ روز، con6: نمونه گرمخانه‌گذاری شده به مدت ٦ روز، con8: نمونه گرمخانه‌گذاری شده به مدت ۸ روز، control: نمونه نوشیدنی پروتئین‌های سویای شاهد. نمونه‌های نگهداری شده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد (نمودار بالا). نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (نمودار پایین).**

نتیجه‌گیری

در این تحقیق پروتئین‌های سویا و دکستران از طریق واکنش طبیعی مایلارد کانژوگه شدند. الکتروفورز SDS-PAGE، اندازه‌گیری میزان قهوه‌ای شدن و اندازه‌گیری میزان جذب در ناحیه UV نشان داد که بیشترین کانژوگه شدن در نمونه ۸ روز گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۶۰ درجه و pH معادل ۸/۵ رخ داده است. نتایج DSC افزایش قابل توجه دمای دناتوراسیون را با کانژوگه شدن نشان داد و حلالیت نیز با کانژوگه شدن بهبود یافت. در نمونه پودر نوشیدنی سویا تهیه شده بر پایه پروتئین‌های کانژوگه شده در مقایسه با پودر نوشیدنی سویای تهیه شده بر پایه پروتئین‌های طبیعی میزان پخش‌پذیری در آب بیشتر شد. واکنش طبیعی مایلارد روشی مناسب جهت بهبود پایداری و خصوصیات عملکردی پروتئین‌های سویا به منظورکاربردهای صنعتی می‌باشد.

منابع

Aminlari, M., Ramezani, R., and Jadidi, F., 2005. Effect of Maillard-based conjugation with dextran on the functional properties of lysozyme and casein. *J Sci Food Agric*. 85: 2617–2624.

Ajandouz, E, Desseaux, V, Tazi, S. and Puigserver, A, 2008, Effects of temperature and pH on the kinetics of caramelisation, protein cross-linking and Maillard reactions in aqueous model systems, *Food Chemistry*, 107: 1244–1252

Alahdad, z., Ramezani, R., Aminlari, M., and Majzoobi. M., 2009. Preparation and Properties of Dextran Sulfate-Lysozyme Conjugate. *J.Agric.Food Chem*. 57: 6449–6454.

Babiker, E., Hiroyuki, A., Matsudomi, N., Iwata, H., Ogawa, T., Bando, N., and Kato, A. 1998. Effect of Polysaccharide Conjugation or Transglutaminase Treatment on the allergenicity and functional properties of soy protein. J.Agric. *Food Chem*, 46: 866-871.

Boostani, S., Aminlari, M., Moosavi-nasab, M., Niakosari, M., Mesbahi, GH. 2016. Optimizing the glycation extent of SPI-dextran conjugates produced by different Maillard reaction conditions. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 12: 526-532.

Boostani, S., Aminlari, M., Moosavi-nasab, M., Niakosari, M., Mesbahi, GH. 2016. Physicochemical and functional properties of acid precipitated soy proteinsmaltodextrin conjugates. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 12: 453-462.

Chiu, T., Chen,M., and Chang, H, 2009. Comparisons of emulsifying properties of maillard reaction products conjugated by green, red seaweeds and various commercial proteins. Food Hydrocolloids, 23: 2270–2277.

Diftis, N. and Kiosseoglou, V. 2006. Stability against heat-induced aggregation of emulsions prepared with a dry-heated soy protein isolate–dextran mixture. *Food Hydrocolloids*. 20: 787–792.

Damodaran, S. (1996). Amino Acids, Peptides and Proteins. In: Food Chemistry, 3rd ed.; Fennema, O. R., Ed.; Dekker: New York, 321-330.

Dickinson, E., 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17: 25–39.

Endres, J. G., 2001. Soy Protein Products Characteristics, Nutritional Aspects, and Utilization. AOAC Press, *Champaign* IL. 16-30.

Jinapong, N., Suphantharika, M., Jamnong, P., 2008. Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration, *Journal of Food Engineering* 84: 194–205.

Kato, A., Shimokawa, K., and Kobayashi, K, 1991. Improvement of the Functional Properties of Insoluble Gluten by Pronase Digestion Followed by Dextran Conjugation. *J. Agric. Food Chem*., 39: 1053-1058.

Kato, A., 2002. Industrial applications of Maillard-type protein- polysaccharide conjugates. Food Sci Tech Res., 8: 193-199.

Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.

Li, Y., Lu, F, Luo, C, Chen, Z, Mao, J, Shoemaker, C, Zhong, F, 2009, Functional properties of the Maillard reaction products of rice protein with sugar, *Food Chemistry*, 117, 69–74

Lertittikul, W, Benjakul, S. and Tanaka, M, 2007, Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein–glucose model system as influenced by Ph, *Food Chemistry*, 100: 669–677

Li, Y, Zhong, F, Ji, W, Yokoyama, W, Shoemaker, C. F, Zhu, S, Xia, W, 2013, Functional properties of Maillard reaction products of rice protein hydrolysates with mono, oligo and polysaccharides, *Food Hydrocolloids*, 30: 53-60.

Liu, Y., Zhao, G., Zhao, M., Ren, J. and Yang, B., 2012. Improvement of functional properties of peanut protein isolate by conjugation with dextran through Maillard reaction. *Food Chem*., 131: 901-906.

Mu, L., Zhao, M., Yang B., Zhao, H., Cui, C., Zhao, Q., 2010. Effect of ultrasonic treatment on the graft reaction between soy protein isolate and gum acacia and on the physicochemical properties of conjugates. J. Agric. *Food Chem*, 58: 4494–4499.

Millqvist-Fureby, A., Elofsson, U., and Bergenstahl, B., 2001. Surface composition of spray-dried milk protein-stabilised emulsions in relation to pre-heat treatment of proteins. Colloids and Surfaces B: *Biointerfaces*, 21: 47–58.

Pearce, K. M. and Kinsella, J. E. 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimeric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26: 716-723.

Qi, J., Yang, X. and Liao, J. 2009. Improvement of functional properties of acid-precipitated soy protein by the attachment of dextran through Maillard reaction, *INT J Food Sci Technol*., 44: 2296–2302.

Touré1, A., Zhang, X., Tolno, M., Xia, L., Xueming, X. 2009. Preparation of soybean protein isolate (SPI) drinks using ginger essential oil and oleoresin as flavouring agents. As. *J. Food Ag-Ind,* 2: 72-79

Usui, M., Tamura, H., Nakamura, K., Ogawa, T., Muroshita, M., Azakami, H., Kanuma, S., and Kato, A, 2004. Enhanced bactericidal action and masking of allergen structure of soy protein by attachment of chitosan through Maillard-type protein-polysaccharide conjugation. *Nahrung/Food*, 48: 69 – 72.

Xu , C.H., Yang, X.Q., Yu , S.J., Qi, J.R., Guo, R., Sun, W.W., Yao, Y.J., and Zhao, M.M., 2010, The effect of

glycosylation with dextran chains of differing lengths on the thermal aggregation of β-conglycinin and glycinin, *Food Res* Int, 43: 2270–2276.

Yadav, M.P., Strahan, G.D., Mukhopadhyay, S., Hotchkiss, A.T., Hicks, K.B., (2012) Formation of corn fiber gumemilk protein conjugates and their molecular characterization, *Food Hydrocolloids*, 26, 326-333

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 1, Apr. May. 2017, p. 180- 190

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۳، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۳۹۶ ص.۱۹۰-۱۸۰

Functional and stability profile changes of soy proteins cross linked with dextran through natural Maillard reaction

S. Boostani[1], M. Moosavi-nasab[2], M. Aminlari[3*], M. Niakosari[4], Gh. R. Mesbahi[5]

Received: 2014.06.15
Accepted: 2015.05.11

Introduction: Proteins play a fundamental role in biological systems and are often sensitive against organic solvents, heat and other damaging factors. Proteins are the basic component of food formulations and enhancement the functional characteristics and stability of the proteins has always been the main goal of food industry engineers. One of the natural ways used for protein modifications is Maillard reaction. Maillard reaction as a result of covalent binding between the available amino groups of the proteins and carbonyl containing moiety of the polysaccharides, causes a loss in free amino group content of the mixture. Protein- polysaccharide hybrids, as a result of dry heating of two biopolymers mixture under controlled reaction conditions, cause the emergence of conjugates with novel functionalities. Much research has shown that conjugation can increase thermal stability and functional characteristics of food proteins and also reduce the allergenicity of suspected proteins. Although many studies have been conducted on the effects of conjugation on functional properties of proteins, the impacts of conjugation on proteins behavior after food processing have been less investigated. So, in this paper the influences of Maillard reaction on functional properties of soy proteins have been investigated. In addition, characteristics of conjugated proteins after pasteurization treatment was also studied.

Materials and methods: Construction of protein- polysaccharide conjugates was done in several steps. First, soy proteins and dextran were mixed with phosphate buffer (0.1 M, pH: 8.5) and 1 to 4 ratio of protein to polysaccharide. After mixing and incubating at ambient temperature for some hours, solutions were frozen at –80 °C and freeze dried. Then the lyophilized powder was incubated at different times, at 60°C, under the 79 percent relative humidity in presence of saturated KBr. For each treatment a non conjugated sample was prepared in the exact same condition. Conjugation of proteins to polysaccharides was monitored by SDS-PAGE electrophoresis, browning intensity measurement and UV absorbance analysis. SDS-PAGE was conducted according to Laemmli procedure using a discontinuous buffer system. A vertical gel electrophoresis unit was used with 3% acrylamide stacking gel and 10% acrylamide running gel. Evaluation of the color changes as an indicator of grafting intensity was investigated by monitoring absorption at a wavelength of 420 nm. To investigate the UV absorption of conjugated proteins, the samples were diluted with SDS (Sodium dodecyl sulfate) solution and the absorption was read by a UV-visible spectrophotometer at 294 nm. The impact of modification on characteristics of soy proteins was monitored by examining the functional properties changes of protein samples. In the last stage soy drinks were prepared from conjugated and non conjugated proteins then the prepared beverages were subjected to thermal processing conditions and the influences of Maillard conjugation on the stability of soy drinks was monitored over time.

Results and Discussion: SDS-PAGE electrophoresis profile showed that proteins-polysaccharide conjugates were formed. As a result of conjugation, the protein-dextran covalent binding occurs, leads to the formation of higher molecular weight components, resulting in its accumulation on the top of the separating gel. When *heating* time increased a wider and higher molecular weight bands appeared near the top of the running gel however they were not observed in the native soy pattern. Covalent linkage between amino group of proteins and carbonyl group of polysaccharides causes a color changes from light yellow to brown, browning intensity results showed that the even during early incubation time, a significant absorption was observed at 420 nm compared to the control samples. UV absorption results showed similar trend of changes in browning intensity measurement.

1, 4 and 5. Ph.D candidate, Professor and Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2. Professor, Department of Food Science and Technology and Sea Food Processing Research Group, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
3. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Department of Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.
(*Corresponding author: aminlari@shirazu.ac.ir)

Increasing UV absorption is due to the intermediate Maillard reaction products (MRP). Increasing UV absorption with increasing heating time indicates the fact that Maillard reaction products (MRP) formation are more favorable in the long incubation time. Data of UV absorption are a good evidence for SDS-PAGE and browning intensity results. Functional properties results indicated that grafted proteins had better functional properties. The storage stability of soy drinks prepared from conjugated proteins was significantly higher than the samples prepared from non conjugated proteins. Stability of beverages after thermal processing and during storage is one of the most important features of protein drinks and many efforts have been made to develop mentioned characteristics. Stability of soy drinks produced from the conjugated proteins was significantly higher than those prepared from non conjugated soy proteins. Functional characterization of proteins is dependent on several factors, the majority of soy drink composed of proteins that could be denaturated by heating applied during thermal processing, as the results showed conjugation with dextran caused an increase in denaturation temperature of soy proteins which enhance the resistance of proteins during thermal processing treatment. In addition, the solubility and emulsifying properties of soy proteins increased with conjugation which can be a good reason for improvement the relation between protein and surrounding water molecules and therefore increases the protein storage stability. It can be concluded that Maillard reaction could be applied as a means to prepare soy proteins–dextran conjugates with better functional properties and more stable during processing and storage.

Keyword. Stability, Heat processing, Maillard reaction, Soy proteins